

(54) ENDOTOXIN ADSORBENT AND REMOVING METHOD OF ENDOTOXIN
USING THE SAME

(11) 58-13519 (A) (43) 26.1.1983 (19) JP
(21) Appl. No. 56-111340 (22) 16.7.1981
(71) SEIKAGAKU KOGYO K.K. (72) MAKOTO NIWA(2)
(51) Int. Cl. A61K37/02, A61M1/03, B01D15/00

① abstract

PURPOSE: To remove an endotoxin which is a substance exhibiting the pyrexia or shock symptoms on invasion into the human body, by bringing an adsorbent consisting of an immobilized polymyxin into contact with a solution containing endotoxin, and separating adsorbent.

CONSTITUTION: A polymyxin which is a cyclic peptide antibiotic substance is immobilized in an insoluble carrier, e.g. agarose, to give an endotoxin adsorbent. A solution containing an endotoxin is brought into contact with the adsorbent, and the adsorbent is then separated to give a solution containing no endotoxin. The endotoxin is a complex of a ribopolysaccharide with a protein constituting the exosporium of Gram-negative bacteria, being heat resistant and chemically stable and easily inactivated. The use of the adsorbent permits the separation and removal of the endotoxin even under mild conditions, and the action of the endotoxin can be removed from the drug or medicinal tools.

(54) POWDERY PHARMACEUTICAL OF MYELOPEROXIDASE

(11) 58-13521 (A) (43) 26.1.1983 (19) JP
(21) Appl. No. 56-111017 (22) 16.7.1981
(71) MIDORI JUJI K.K. (72) RIYUUTAROU YAMANA(2)
(51) Int. Cl. A61K37/50//A61K9/00

PURPOSE: A powdery pharmaceutical, containing myeloperoxidase germicidal or inactivating action on pathogenic germs and albumin as a stabilizer, and storable for a long term.

CONSTITUTION: About 3~70W/V% albumin is added to a myeloperoxidase which is a basic hemoprotein contained in a cell derived from marrow in a large amount and belongs to the oxidation-reduction enzyme to give a stable powdery pharmaceutical. The albumin is derived from a man, and preferably has a purity $\geq 80\%$. The powdery pharmaceutical is preferably freeze-dried, and the albumin may be added to the myeloperoxidase solution before or just after the freeze-drying thereof. The myeloperoxidase is useful as a remedy for tuberculosis.

(54) MEDICINAL COMPOSITION HAVING ANTITUMOR ACTION

(11) 58-13523 (A) (43) 26.1.1983 (19) JP
(21) Appl. No. 56-112856 (22) 18.7.1981
(71) MOCHIDA SEIYAKU K.K. (72) HARUO OONISHI(3)
(51) Int. Cl. A61K37/54

PURPOSE: The titled composition, containing a protease purified from a human urine as an active constituent, and having a high safety.

CONSTITUTION: A human urine is passed through a DEAE-cellulose column equilibrated with a 0.1M acetic acid/buffer solution (pH : 5.3) to adsorb an acidic protease on the column. The adsorbed protease is then eluted with the same buffer solution containing 0.3M NaCl. The eluate is then concentrated and purified by the gel chromatography with "Sephadex G100®" swollen with a 0.9% physiological saline solution treated with an acid to give the aimed acidic protease, having a molecular weight of 3,200~38,000 and an isoelectric point of 1~3 measured by the electrophoretic method with the isoelectric point using "Ampholine®", a maxial absorption of 278mn, positive to the ninhydrin reaction, and readily soluble in water and insoluble in ether or chloroform. The resultant protease is used as an active constituent to give a drug having sufficient anti-tumor action and high safety. The dose of the remedy is 1~1,000mg/day for an injection.

⑪ 特許公報 (B2)

平1-16389

⑫ Int. Cl.
G 01 N 33/579

識別記号

庁内整理番号
7906-2G

⑬ ⑭ 公告 平成1年(1989)3月24日

発明の数 2 (全4頁)

⑮ 発明の名称 エンドトキシン吸着材及びそれを用いるエンドトキシンの除去方法

⑯ 特願 昭56-111340

⑯ 公開 昭58-13519

⑯ 出願 昭56(1981)7月16日

⑯ 昭58(1983)1月26日

⑰ 発明者 丹羽允 大阪府堺市東三国ヶ丘町2-1-23-302

⑰ 発明者 梅田優 大阪府堺市復元町4-4-28

⑰ 発明者 松本章義 東京都東大和市立野3-1253 生化学工業株式会社東京研究所内

⑯ 出願人 生化学工業株式会社 東京都中央区日本橋本町二丁目1番5号

⑯ 代理人 弁理士 津国聰

審査官 菅野芳男

1

2

⑰ 特許請求の範囲

- 1 固定化ポリミキシンからなることを特徴とするエンドトキシン吸着材。
- 2 固定化ポリミキシンからなる吸着材をエンドトキシン含有液に接触させた後、該吸着材を分離することを特徴とするエンドトキシンの除去方法。

発明の詳細な説明

本発明は、エンドトキシン吸着材及びそれを用いるエンドトキシンの除去方法に関し、さらに詳しくは、固定化ポリミキシンからなるエンドトキシン吸着材及びそれを用いるエンドトキシンの吸着除去方法に関するものである。

エンドトキシンは、グラム陰性菌細胞壁の外膜を構成するリポ多糖と蛋白の複合体であり、人体に侵入した場合に強い発熱作用やショック症状を示す物質として医療上注目を集めている。

このエンドトキシンの存在を確認する方法として、カブトガニアメーバ様細胞抽出液 (LAL) を用いるリムルステストがこれまで活用されてきたが、定量性、感度の点から充分とはいえない。しかし、本発明者らの出願に係る合成基質を用いる改良されたLAL-テストにより、エンドトキシンの作用及び構造研究が一段と進展したきた。

エンドトキシンは、耐熱性で化学的にも安定で

あり適当な失活の方法がなく、薬剤汚染やエンドトキセミアの治療の壁になっている。加熱、酸、アルカリ処理更に界面活性剤等によるエンドトキシンの不活化は、薬剤の本来の性質や生体構成物質を損うことなく実施することはできない。

しかしながら、生理的な条件下でエンドトキシンの活性を不活させるものとして、ポリミキシンが知られている。ポリミキシンは、バチルス・ポリミキサ (Bacillus polymyxa) の產生するジアミノ酸を含む環状ペプチド性抗生物質で、ポリミキシンA、B、C、D、E、K、M及びPが分離されているが、いずれも生体内でエンドトキシンの作用を中和することが知られている。しかしながら、これらは強い副作用を有する故に医薬として使用されるのはこのうちで1~2種である。また、このポリミキシンのエンドトキシン不活化作用の機構解明は未だ確立されていない。

本願発明者らは、エンドトキシンの生理活性の機構解明の一環としてエンドトキシン活性の不活化の検討を行ない、抗生物質ポリミキシンによるエンドトキシンの生体内活性の不活化がポリミキシンとエンドトキシンの強い親和性により強固な複合体を形成し、結果的に、ポリミキシン及びエンドトキシンの活性がそれぞれ不活化されるという新規事実を見出した。この性質を利用すればエンドトキシンを温和な条件下で分離除去すること

が可能となり、人体に直接、間接に適用される医薬や医療用具からエンドトキシンの作用を除去することが可能となる。

本発明の目的は、ポリミキシンを不溶性担体に固定化することによるエンドトキシン吸着材の提供と、該吸着材の利用法としてのエンドトキシンの除去法の提供にある。

本発明のエンドトキシン吸着材はポリミキシンとエンドトキシンの親和性を利用することを原理とするものであり、その不溶性担体として、アガロース、架橋アガロース、セルロース粉並びに成形化セルロース誘導体、デキストランゲルの如き多糖体系樹脂、ポリビニルアルコール系樹脂等の多価アルコール性水酸基を有する球状又は不定形のクロマトグラフィー用担体や纖維状、膜状医用高分子が使用できる。また、これら不溶性担体とポリミキシンとの結合反応は、担体の有する水酸基と、ポリミキシンの分子中に複数個存在するアミノ基との間の化学的共有結合化の公知の方法を採用することができる。例えば、BrCN活性化法、塩化シアヌール法、エポキシド等を用いるオキシラン開裂反応、ハロゲン化アセチル誘導体を用いる直接担体に結合する方法でもよいし、又、ベキサメチレンジアミンをスペーサーとして用いイソシアナート誘導体を中間体としてポリミキシンを結合せしめる方法等も使用できるが、本発明の目的とするところは、担体固定化ポリミキシンによるエンドトキシンの吸着材であるので、本発明の目的とする範囲を越えないエンドトキシン吸着材の製造方法は全て適用できる。」

エンドトキシン含有液中のエンドトキシンを除去するには、上述した固定化ポリミキシンとエンドトキシンを接触させた後、固液を分離し、エンドトキシンを含まない液を得ることができる。接触の方法は、例えば吸着材をエンドトキシン含有液中に懸濁混合した後、沪別してエンドトキシンを含まない液を得てもよいし、吸着材をカラムに充填し、エンドトキシン吸着カラムを調製し、これに、エンドトキシン含有液を通すことにより、溶出液として、エンドトキシン・フリーの液を得ることもできる。また、本発明の吸着材はそれ単独で用いてもよいし、他の適当な担体と組合させて用いてもよい。

本発明を実施例に基づき具体的に説明する。

実施例 1

エンドトキシン吸着材 I

ポリミキシンーセファロース・CL-4Bの調製

架橋アガロース担体 (Sepharose・CL-4B)

5 50mlに2.3gのBrCN/50mlH₂Oを加え4°Cに冷却した。5NNaOHをpH11±0.2に、温度を10~15°Cに保ちながら8~10分間で滴下して、活性化した。無菌冷水を用いて充分洗浄しブナーロート上の余分の水を除いた。無菌条件下に洗浄した
 10 BrCN活性化架橋アガロース担体10g(湿潤状態)をカツプリング緩衝液(0.1M NaHCO₃、0.5M NaCl、pH8.3)20mlに懸濁せしめ、次いで、硫酸ポリミキシンB(台糖ファイザー製)1.0g/20ml緩衝液を加え室温下4時間攪拌反応せしめた。未反応の活性基を0.2Mグリシン・トリス塩酸(Tris-HCl)緩衝液(pH8.0)にて不活化しブナーロートを用いて沪過した後、酢酸緩衝液(pH4.0)にて洗浄し、10mlのエンドトキシン吸着材ポリミキシンーセファロース・CL-4Bを得た。

実施例 2

エンドトキシン吸着剤 II

コリスチン(ポリミキシンE)・セルロースビーズの調製

25 市販セルロースビーズ(セルロフайн®、テツソ株製造)GC-700をグラスフィルター上で充分水洗し、吸引沪過したビーズ(湿潤状態)2g当り2mlの1,4-ブタンジオールグリシジルエーテル(Aldrich Chemicals Company, Inc製)30と2mgのNaBH₄を含む0.6M NaOH2mlを加え、25°Cの反応槽中で振盪した。8時間後グラスフィルター上で吸引下水洗し、約1.6ミリモル(mole)のエポキシ基を導入したエポキシ基導入セルロースビーズを得た。

35 このエポキシ化セルロースビーズ2gに、コリスチン硫酸(特薬抗生製造)400mg/1M Na₂CO₃4mlを加え25°Cで16時間振盪反応せしめた。未反応のエポキシ基を1Mエタノールアミン中、室温下で8時間処理し活性をなくした。反応40沪液からのコリスチンの回収率から逆算してほぼ90%のコリスチンが結合したコリスチン・セルロースビーズ(湿潤状態)約2gを得た。

実施例 3

エンドトキシン吸着材によるエンドトキシンの

除去 I

実施例 I で調製したエンドトキシン吸着材 I のカラム ($1 \times 5 \text{ cm}$) に *E.coli* UKTB のエンドトキシン生理食塩水溶液 ($10 \text{ ng}/\mu\text{l}$) $1 \mu\text{l}$ を添加し滅菌トリスーHCl (pH7.2, 0.05M) で溶出したが、溶出液中には、従来のゲル化によるリムルステストでも、発色性基質によるエンドトキシン測定法でも、エンドトキシンは検出されなかつた。

方 法	添加液	流下液	対照(注射用蒸留水)
ゲル化($37^\circ, 60'$)	+	-	-
発色基質による方法($A405/30' / 1.2 \mu\text{l}$)	$1200 <$	0.026	0.026

実施例 4

* エンドトキシン吸着材によるエンドトキシンの除去 II

実施例 2 で調製したエンドトキシン吸着材 II のコリスチン・セルロースビーズ 1 g をトリスー塩酸緩衝液 (pH7.2, 0.01M) + NaCl (0.03M) 約 $1 \mu\text{l}$ に懸濁し、これをカラムに充填して、水道水を $0.1 \mu\text{l}/\text{分}$ の速度で通過せしめたところ、通過液のエンドトキシンはほとんど除去されていた。

エンドトキシン検出法	通過前($1 \mu\text{l}$ 当り)	通過液($1 \mu\text{l}$ 当り)	対照(注射用蒸留水)
ゲル化($37^\circ, 60'$)	+	-	-
発色性基質による方法($A405/1.2 \mu\text{l}/30'$)	1200 (エンドトキシン量: $2 \text{ ng}/\mu\text{l} <$)	0.004 (エンドトキシン量: ほぼ0)	0.023

実施例 5

エンドトキシン吸着材によるエンドトキシンの除去 III

実施例 1 で調製したエンドトキシン吸着材 I (Polymixin-Sepharose CL-4B) をトリスー塩酸緩衝液 (pH7.2, 0.01M) に懸濁して $10 \times 500 \text{ cm}$ のカラムを調製し、これに輸液調製用の精製水を通過せしめてエンドトキシンの除去効果を確めた。

その結果、同カラムを通過せしめた精製水を用いて調製した輸液にはエンドトキシンは検出されなかつたが、カラムを通過せしめなかつたものではエンドトキシンが検出された。

実施例 6

エンドトキシン吸着材 III

シアノゲンプロマイド (プロムシアン) 活性化セファロース (ファルマシア社製) を用い、下記に示す工程により、ポリミキシンと反応させ、ポリミキシンのアーミノ基をセファロースに共有結合させた。

セファロース4B

$1 \mu\text{l}$ HClで洗浄

カツプリング緩衝液 (pH8.3, $\text{NaHCO}_3 0.1\text{M}$, $\text{NaCl} 0.5\text{M}$) で洗浄

+ ポリミキシンB 硫酸塩 $100 \text{ mg}/\text{g}$
室温下で振盪 (2時間)

+ プロツキング剤 (グリシン, pH8, 0.2M 又は
トリスーHCl, pH8, 0.1M) 4°C で 16 時間放置
カツプリング緩衝液で洗浄

酢酸緩衝液 (pH4.05 + $\text{NaCl} 0.5\text{M}$) で洗浄

カツプリング緩衝液で洗浄

ポリミキシン・セファロース (Px-Seph)

- ポリミキシンセファロースは遊離 polymixin が検出されなくなるまで、滅菌蒸留水で洗浄した。

反応時にポリミキシンの濃度を高くすると結合するポリミキシンの絶対量は多くなるが、逆に結合率は低下する (次表参照)。

用いたポリミキシン量 (mg/g セファロース)	10	30	100
結合ポリミキシン量 (mg/g セファロース)	4	12	36

結合率(用いたポリミキシン量 を100としたときの%)	92	82	30
--------------------------------	----	----	----

また、結合したポリミキシンとエンドトキシンの結合率は次の表の通りであつた。

結合ポリミキシン量 ($\mu\text{g}/\text{g}$ セファロース)	2	5	9	18	36
結合エンドトキシン量 ($\mu\text{g}/\text{g}$ セファロース)	3.2	5.0	5.2	6.5	7.5
結合比(エンドトキシン 量/ポリミキシン量)	1.6	1	0.6	0.4	0.2

測定法

なお、実施例において用いる測定法について述べる。

1 ポリミキシン測定法

イザーキ及びギル (Itzhaaki & Gill) のミクロビュレット法で測定した。

(文献 : R. F. Itzhaaki & D. M. Gill : Anal. Biochem. 9, 401(1964))

2 発色性基質 (Chromogenic substrate) によるエンドトキシンの測定法

測定試薬はバイロディック® (生化学工業株発売) を用いた。この試薬は、N-第三ブチルオキシカルボニルロイシルグリシルアルギニンバラニトロアニリド (Boc · Leu · Gly · Arg - pNA) 及びカブトガニ血球抽出液を含む製剤で、岩永らの方法をもとに調製されており、同法によつてエンドトキシンの定量が可能である。

(文献 : 中村 (S. Nakamura)、森田 (T. Morita)、岩永 (S. Iwanaga)、丹羽 (M. Niwa)、高橋 (K. Takahashi)、J. Biochem. 81, 1567(1977); 岩永 (S. Iwanaga)、森田 (T. Morita)、原田 (T. Harada)、中村 (S. Nakamura)、丹羽 (M. Niwa)、高田 (K. Takada)、木村 (T. Kimura)、榎原 (S. Sakakibara)、Haemostasis, 7, 183(1978))